様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：２４６５９７６３
研究課題名（和文）網膜色素変性の視細胞死における慢性炎症の関与

研究課題名（英文）The relation between chronic inflammatory reaction and photoreceptor cell death in retinitis pigmentosa

研究代表者
池田　康博（Ikeda, Yasuhiro）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：２０３８０３８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円、（間接経費）　　810,000円

研究成果の概要（和文）：　網膜色素変性のモデル動物であるrd10マウスにおいて、視細胞がアポトーシスを生じる前に炎症性サイトカインやケモカインの発現が網膜で上昇しており、視細胞死が生じている時期に活性化したマイクログリアが網膜内（特に外顆粒層）認められた。また、これらの炎症反応は抗酸化剤であるN-アセチルシステインによって抑制された。以上の結果より、網膜内の慢性的に持続する炎症反応により視細胞のアポトーシスが誘導されており、抗酸化剤を用いた眼内炎症反応に対する介入が網膜色素変性患者への治療法となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated sequential events involving increased expression of proinflammatory cytokines and chemokines, activation of microglia, and photoreceptor apoptosis during retinal degeneration of rd10 mice. Furthermore, antioxidant treatment with N-acetylcysteine prevented the photoreceptor cell death along with suppression of inflammatory factors and microglial activation. Sustained chronic inflammatory reaction may contribute to the pathogenesis of retinal degeneration in rd10 mice, suggesting interventions for ocular inflammatory reaction using antioxidants as a potential treatment for patients with RP.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜色素変性　視細胞死　慢性炎症　抗酸化剤

１．研究開始当初の背景

網膜色素変性は先天性遺伝性の疾患で、人口5,000人に１人と頻度が高く、日本には約3 万人の患者がいると推定されている。夜盲よりはじまり、徐々に視機能が低下して最終的には失明に至るため、患者の Quality of Life（QOL）は病気の進行とともに著しく低下する。これまでに多くの治療的試みがなされているものの、有効性を示し得たものは存在せず、眼科領域において**未だ有効な治療法が確立されていない難治性疾患**のひとつである。

近年、分子生物学的手法の進歩とともに数多くの原因遺伝子が同定されているものの、原因遺伝子によってどのように視細胞死（アポトーシス）が生じるかについては不明な点が多く、また患者の原因遺伝子を同定する遺伝子診断システムも整備されていない。このような現状では、**原因遺伝子に依存しない RP に共通した病態**を解明し、そのメカニズムに則した治療法を開発することが我々の大きな課題となる。これまでに我々は、原因遺伝子の異なる網膜色素変性モデル動物を用いた研究により、アポトーシス誘導因子（AIF）のミトコンドリアからの放出が視細胞死に共通する重要な役割を担っていることを明らかとした（Murakami Y, et al,, Am J Pathol. 2008.）。一方で、酸化ストレスが視細胞死を調節する因子であることを想定して、抗酸化剤投与による視細胞死制御を試みる研究も数多く行われており、疾患モデル動物では一定の治療効果が報告されている（Komeima K, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006.）。

我々は、第115回日本眼科学会総会において、黄斑上膜を合併した RP 患者の硝子体液中に、**炎症性サイトカインやケモカインが多量に含まれていることを報告した**。また、網膜色素変性モデル動物でも同様に、網膜における炎症性サイトカインやケモカインの発現が亢進していることを報告した。これらの結果から、原因遺伝子に依存しない RP に共通した視細胞死を調節する因子として、**慢性炎症に注目して本研究を進めることとした。**

２．研究の目的

網膜色素変性の病態の理解と新しい治療法開発のターゲットを探索するために、疾患モデル動物ならびに患者より採取したサンプルから網膜色素変性の視細胞死と慢性炎症との関連を解析する。最終的には、高感度C反応性蛋白（CRP）濃度が網膜色素変性の病勢の指標となりうるかについて検証する。研究期間内に以下のテーマについての研究を実施し、網膜色素変性における視細胞死と慢性炎症の関連を明らかとする。

（１）網膜色素変性モデル動物における慢性炎症の関与

（２）網膜色素変性モデル動物を用いた抗炎症療法による治療効果の検討

（３）網膜色素変性患者より採取した前房水中の炎症性サイトカイン、ケモカイン濃度の測定

（４）網膜色素変性患者より採取した血清中のC反応性蛋白の定量

３．研究の方法

（１）網膜色素変性モデル動物における慢性炎症の関与

rd10 マウス（Background: C57BL6）は自然発症の網膜色素変性モデル動物で、*PDE6B* 遺伝子のミスセンス変異によって発症する。生後18日頃より視細胞のアポトーシスが始まり、生後21日でピークとなる。一方、RCS ラットは *Mertk* 遺伝子の変異によって発症する網膜色素変性モデル動物で、生後21日頃より視細胞のアポトーシスが始まり、生後28日から35日の間にピークとなる。本研究テーマでは、原因遺伝子の異なるモデル動物を用いて、以下の実験を行う。

<u>実験１：網膜における炎症性サイトカイン、ならびにケモカインの経時的発現変化の解</u>

析

①網膜より mRNA を採取し、real-time PCR 法を用いて各因子の発現量を経時的に測定する。(一部の因子については検証済み)(対照：正常マウス、ならびに正常ラット網膜)

②multiplex ELISA 法を用いて、網膜内の各因子のタンパク量を経時的に測定する。(対照：正常マウス、ならびに正常ラット網膜)

実験２：網膜における経時的組織変化の評価

免疫組織化学的手法を用いて、炎症細胞ならびにマイクログリアを染色する。TUNEL 染色を用いて視細胞のアポトーシスとの関連を検討する。また、上記実験で発現亢進が認められた因子について、主要な産生細胞の同定を試みる。

（２）網膜色素変性モデル動物を用いた抗炎症療法による治療効果の検討

本研究テーマにおいても、上記疾患モデル動物を使用して以下の実験を行う。

実験１：非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）を用いた検討

プロスタグランジン生合成阻害作用のあるジクロフェナック、プラノプルフェン等を全身投与（経口、もしくは腹腔内投与）、ならびに局所投与（点眼、もしくは硝子体内投与）する。経時的に眼球を摘出し、投与群と非投与群で視細胞数、TUNEL 陽性細胞数、浸潤した炎症細胞（免疫組織化学的染色）、上記実験で発現亢進が認められた因子の発現量（real-time PCR 法）について比較検討し、治療効果を判定する。

実験２：ステロイドを用いた検討

上記実験と同様に、ステロイドを全身投与、ならびに局所投与し、治療効果を判定する。

（３）網膜色素変性患者より採取した前房水中の炎症性サイトカイン、ケモカイン濃度の測定

我々は黄斑上膜を合併した網膜色素変性患者の硝子体液中に炎症性サイトカイン、ならびにケモカインが高濃度に含まれていることを報告した（吉田倫子、他. 第 115 回日本眼科学会総会）。しかしながら、硝子体手術の適応となる症例は限られており、網膜色素変性患者から硝子体液を採取する機会は多くない。そこで、比較的症例数の多い白内障手術の際に前房水を採取し、前房水中に含まれる炎症性サイトカイン、ケモカインを測定することとした（年間 15 例前後）。平成 24 年度より開始し、平成 25 年 12 月末までサンプルを収集する。

①患者選択基準

適格基準：以下のすべての条件を満たす患者。

(1) 厚生労働省特定疾患治療研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮に関する調査研究班の定める診断基準に従い、2 名以上の眼科専門医によって定型網膜色素変性と診断された患者

(2) 本人から文書同意を取得した患者

除外基準（抜粋）：下記のいずれかに該当する場合は対象から除外する

(1) ぶどう膜炎などにより活動性のある眼内の炎症を有する患者

(2) 過去 6 か月以内に非ステロイド系抗炎症薬やステロイドの局所投与を受けた患者

(3) 分担研究担当医師が不適当と判断した患者

②方法

白内障手術開始時に、27G または 30G 針を前房内に穿刺し、前房水を 50-100 μl 採取する。採取後は速やかにエッペンドルフチューブに移し、濃度測定まで-80°C の冷凍庫にて保管する。各因子の濃度は、multiplex ELISA 法を用いて測定する。対照として、他の眼疾患を合併していない白内障患者の前房水を使用する。

（４）網膜色素変性患者より採取した血清中のＣ反応性蛋白の定量

血清高感度 C 反応性蛋白（CRP）は脳卒中や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患をはじめとする様々な慢性炎症の関与する疾患との

関連が報告されている（Iso H, et al. Atherosclerosis 2009.）。本研究テーマでは、網膜色素変性患者の血清 CRP 濃度を測定し、病勢の指標となるバイオマーカーとして使用できるかどうかについて検証する。平成 24 年度より開始し、平成 25 年 12 月末までサンプルを収集する。

①患者選択基準

適格基準：以下のすべての条件を満たす患者。

(1) 厚生労働省特定疾患治療研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮に関する調査研究班の定める診断基準に従い、2 名以上の眼科専門医によって**定型網膜色素変性**と診断された患者

(2) 本人から文書同意を取得した患者

除外基準（抜粋）：下記のいずれかに該当する場合は対象から除外する

(1) 活動性のある炎症を伴う全身疾患を合併する患者

(2) 過去 6 か月以内に非ステロイド系抗炎症薬やステロイドの全身、もしくは局所投与を受けた患者

(3) 分担研究担当医師が不適当と判断した患者

②方法

採血を施行し、血清を分離する。血清は 4°C で保管し、当日中に検査会社に濃度測定を依頼する。

４．研究成果

（１）網膜色素変性モデル動物における慢性炎症の関与

rd10 マウスにおける炎症性サイトカインならびにケモカインの経時的発現変化については、既に検証を終了した（Yoshida N, Ikeda Y, et al. Ophthalmology 2013)。視細胞がアポトーシスを生じる前に IL-1β や MCP-1 などの炎症性サイトカインやケモカインの発現が網膜で上昇しており、視細胞死が生じている時期に活性化したマイクログリアが網膜内（特に外顆粒層）認められた。また、これらの炎症反応は抗酸化剤である N-アセチルシステインによって抑制されたことから、網膜内では酸化ストレスに起因する炎症反応が生じており、視細胞のアポトーシスを誘導していると結論付けた。さらに、RCS ラットにおける検討でもほぼ同様の結果が得られている。

（２）網膜色素変性モデル動物を用いた抗炎症療法による治療効果の検討

RCS ラットを用いて、ステロイド局所投与（生後３週齢に硝子体内投与）ならびにジクロフェナック局所投与（生後３週齢から点眼投与）による視細胞死への影響について検討したが、現時点で明らかな保護効果は認められていない。現在は、マイクログリアに特異的な炎症反応抑制を試みている。

（３）網膜色素変性患者より採取した前房水中の炎症性サイトカイン、ケモカイン濃度の測定

学内倫理委員会における臨床研究実施計画の承認を受け、患者より前房水を採取した。各因子の濃度は、Cytometric Bead Array 法を用いて測定した。既報と同様に、IL-8 や MCP-1 の濃度が対照患者と比較して有意に上昇していた。

（４）網膜色素変性患者より採取した血清中のＣ反応性蛋白の定量

学内倫理委員会における臨床研究実施計画の承認を受けた。サンプル回収中であり、解析はまだ完了していない。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　１件）

Yoshida N, <u>Ikeda Y</u>, Notomi S, Ishikawa K, <u>Murakami Y</u>, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T: Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology* **120**:e5-12, 2013. 査読有

〔学会発表〕（計　１件）

池田康博：網膜色素変性の病態解明と神経保護．第67回日本臨床眼科学会．2013年10月31日-11月3日、横浜

６．研究組織

(1)研究代表者

池田　康博（Yasuhiro Ikeda）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20380389

(2)研究分担者

村上　祐介（Yusuke Murakami）

九州大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50634995